

REC'D 14 MAY 2004

WIPO

PC



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0026015
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 04월 24일
Date of Application APR 24, 2003

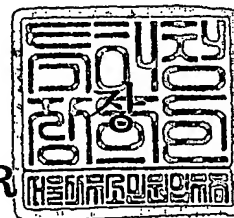
출원인 : 주식회사 태평양
Applicant(s) AMOREPACIFIC CORPORATION



2004 년 04 월 23 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.24
【발명의 명칭】	녹차 성분을 함유하는 피부 외용제 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition for external application to the skin containing the active ingredients of green tea
【출원인】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】	2001-033730-9
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【포괄위임등록번호】	2001-033731-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김지현
【성명의 영문표기】	KIM, Ji Hyun
【주민등록번호】	731107-2785813
【우편번호】	449-907
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 신갈리 52-25번지 302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	안수미
【성명의 영문표기】	AHN, Soo-Mi
【주민등록번호】	700911-2807610
【우편번호】	442-755
【주소】	경기도 수원시 팔달구 원천동 원천주공아파트 103동 708호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이종찬
 【성명의 영문표기】 LEE, Jong Chan
 【주민등록번호】 730909-1037912
 【우편번호】 440-709
 【주소】 경기도 수원시 장안구 조원동 한일타운 142동 1101호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김영경
 【성명의 영문표기】 KIM, Young Kyung
 【주민등록번호】 690909-2030215
 【우편번호】 449-905
 【주소】 경기도 용인시 기흥읍 상갈리 금화마을 주공아파트 510동 1002호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이병곤
 【성명의 영문표기】 LEE, Byeong Gon
 【주민등록번호】 611219-1454636
 【우편번호】 441-838
 【주소】 경기도 수원시 권선구 금곡동 104-3 거산아파트 102동 1206호
 【국적】 KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 윤동열 (인) 대리인
 이선희 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	7 면	7,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	9 항	397,000 원
【합계】		433,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장[2001년 6월 11일자 포괄위임등록]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 녹차(*Camellia sinensis*) 성분을 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 테아닌(theanine) 및 카테킨(catechin)을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하여 지방세포의 피하 지방 분해 효과, 셀룰라이트의 제거 효과가 우수한 지방분해 및 비만억제용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

녹차 * 테아닌 * 카테킨 * 지방세포 * 지방분해 * 중성지방 * 유리지방산 * 글리세롤 * GPDH *
비만 * 셀룰라이트 * 화장료

【명세서】

【발명의 명칭】

녹차 성분을 함유하는 피부 외용제 조성물{Composition for external application to the skin containing the active ingredients of green tea}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 녹차 성분 중 테아닌(theanine)의 중성지방 분해 효과를 나타내는 그래프이다.

도 2은 녹차 성분 중 테아닌(theanine)의 β_3 -adrenergic receptor 발현 조절 효과를 나타내는 그래프이다.

A:대조군

B:카페인(caffeine) 0.005% 처리군

C:테아닌(theanine) 0.005% 처리군

도 3은 녹차 성분 중 카테킨(catechin)의 지방세포 분화 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 녹차 성분 중 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)의 지방세포 내 중성지방 축적 억제 상승 효과를 알아보기 위한 세포실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)을 함유하는 본 발명 피부 외용제 조성물 사용 후의 허벅지 둘레 감소를 나타내는 그래프이다.

도 6는 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)을 함유하는 본 발명 피부 외용제 조성물 사용 후의 피하 지방 감소 효과에 대한 초음파 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)을 함유하는 본 발명 피부 외용제 조성물 사용 후의 슬리밍 효과에 대한 연구자들의 육안 평가 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)을 함유하는 본 발명 피부 외용제 조성물 사용 후의 슬리밍 효과에 대한 사용자들의 육안 평가 결과를 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 12> 본 발명은 녹차(*Camellia sinensis*) 성분을 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 테아닌(theanine) 및 카테킨(catechin)을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하여 지방세포의 피하 지방 분해 효과, 셀룰라이트의 제거 효과가 우수한 지방분해 및 비만억제용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- 13> 본 발명에서는 주로 음용용으로 사용되었던 녹차를 외용제에 적용한 것에 특징이 있다.
- 14> 인체 내에는 약 200억 개나 되는 지방세포가 존재하고 있으며 포유류의 생체 내에서 에너지를 축적하거나 방출하는 역할을 담당하고 있다. 이 세포 내에서는 에너지의 축적과 방출에 대한 복잡한 조절 원리가 존재하는데, 에너지의 수요보다 공급이 월등히 많을 경우에는 지방세포 내에 중성지방으로 저장되었다가, 에너지가 고갈되었을 때 다시 유리 지방산과 포도당으로 분해되어 사용된다. 비만은 이 과정의 불균형으로 인하여 과도한 에너지의 축적이 일어났을 때 발생하는 것으로, 지방세포의 크기가 커지거나 그 수가 증가하는 현상에 기인하는 것으로 보고 있다.
- 15> 아름다운 몸매에 대한 여성들의 관심은 풍족한 생활에 의한 비만의 증가뿐 아니라 여성의 사회적 지위 향상, 경제적 독립, 그리고 질적인 삶의 욕구 등에 따라 급속도로 증대되고 있으며,

이에 따라 과도한 피하 지방의 제거 및 피부 탄력의 증진에 효과적인 슬리밍(slimming) 및 안티 셀룰라이트(anti-celullite) 화장품에 대한 관심도 계속 높아지고 있다.

- 16> 셀룰라이트는 여성의 피부 및 피하 지방에서만 발생하며 과도한 지방과 노폐물의 축적으로 인한 순환 장애로 인하여 거친 오렌지 껍질 같이 울퉁불퉁한 피부가 되는 현상이다. 상기 셀룰라이트의 발생 원인은 단순한 비만과는 차이가 있으나 근본적으로는 지방세포의 증가나 비대에 그 원인이 있으므로 지방세포 내의 지방을 분해하여 배출시켜 주는 것이 궁극적으로는 낯선하고 매끈한 몸매를 만드는데 큰 도움을 줄 수 있다.
- 17> 종래에 알려져 있는 지방 분해 촉진 물질은 대부분 카페인(caffeine), 테오필린(theophylline) 같은 메틸잔틴계(methylxanthine) 물질들로 지방세포 내에서 지방 분해와 밀접한 관련이 있는 효소인 아데닐레이트 사이클레이즈(adenylate cyclase)의 촉진 또는 포스포디에스테라제(phosphodiesterase)의 억제 효과를 통하여 지방 분해 효능을 나타내고 있다. 그러나, 이들은 중독성 물질이라는 좋지 않은 인식이 널리 퍼져 있고, 기관지 확장을 유도하거나 월경 전 증후군 현상을 악화시키는 등 여러 가지 부작용이 있는 것으로 알려져 있어 아직은 안전성에 대한 명확한 보장이 없는 실정이다. 따라서, 이상의 물질과 동등하거나 그 이상의 효능을 나타내면서도 인체에 대해서는 좀더 안전한 새로운 물질을 개발해야 할 필요성이 대두되고 있는 실정이다.
- 18> 한편, 비만을 개선하기 위한 비만 관련 선행 특허에서 데아닌(theanine)을 섭취한 쥐에서 혈중 콜레스테롤 및 내장지방량이 현저하게 감소했음이 공지되어 있지만(일본특허 제 2000-53568호), 아직 데아닌의 체지방에 대한 연구는 미미한 실정이다. 또한, 최근에 녹차의 카테킨(catechin) 성분이 체내의 갈색 지방 세포에서 발열 반응을 촉진하여 지방의 소모를 증가시키

는 것으로 발표되었으나 (International Journal of Obesity, 2000), 녹차 활성 성분의 지방세포에 관한 직접적인 효능과 그 조절 기작에 대해서는 거의 밝혀진 바가 없다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 19> 이에, 본 발명자들은 지방세포 내에서 지방 분해를 촉진하고 지방세포의 분화를 억제하면서도 인체에 안전한 활성 성분을 개발하기 위하여 광범위하게 연구 및 검토한 결과, 녹차의 활성 성분, 특히 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)을 피부에 도포시 지방세포 내 중성지방의 분해를 촉진하는 효능이 뛰어나, 결과적으로 지방세포의 크기를 감소시키고 더 이상의 지방세포의 생성을 막아 피하 지방의 두께와 셀룰라이트를 감소시켜 날씬하고 탄력있는 몸매를 만들고 유지하는데 도움을 준다는 사실을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- 20> 따라서, 본 발명의 목적은 녹차 내에서 지방 분해 촉진 효능이 있는 테아닌(theanine)과 지방세포 분화 억제 효능이 있는 카테킨(catechin)의 신규한 용도를 제공하는 것이다.
- 21> 본 발명의 다른 목적은 상기 성분을 함유함으로써 피하 지방을 감소시키고 여성의 셀룰라이트 부위에서 울퉁불퉁함을 감소시키며 탄력 회복에 뛰어난 효능이 있는 피부 외용제 조성물을 제공하는 것이다.
- 22> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 성분을 피부에 도포함으로써 세포 내의 중성지방 분해를 촉진하는 체지방 제거 방법을 제공하는 것이다.
- 23> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 성분을 피부에 도포함으로써 지방세포의 분화와 비대를 막는 비만 예방 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 24> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 조성물은 세포에서 지방 분해 촉진 효능으로 피하 지방층을 구성하는 지방세포의 대사를 활성화시켜 주는 데아닌(theanine)과 지방세포의 분화를 억제하여 비만의 발생을 차단하는데 효과가 있는 카테킨(catechin)을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 것을 특징으로 한다.
- 25> 특히, 본 발명은 식용으로 사용하던 녹차 성분을 피부 외용제에 적용하는 것을 특징으로 한다.
- 26> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- 27> 본 발명에서 이용한 녹차(*Camellia sinensis*)는 동백나무과의 상록관목으로 일반적으로 그 싹이나 잎을 제조 공정 중에 발효시키지 않고 가공한 것을 녹차라 지칭한다. 녹차는 BC 2700년 중국의 신농 시대부터 마셨다는 기록이 전해져 오고 있으며, 우리 나라에는 문헌에 신라 선덕왕 때부터 차를 음용하였다고 전해진다. 또한, 녹차에는 카테킨(catechin), 플라보노이드(flavonoid), 데아닌(theanine), GABA, 카페인(caffeine), 타닌(tannin) 등과 각종 비타민(vitamine)이 함유되어 있어 항암, 항산화, 항균, 소취, 혈압강하, 면역기능 증강 등 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 다이어트에도 효과적인 것으로 보고되고 있다. 특히, 카테킨 성분은 항산화, 항암, 항균, 심장병 발생 억제에 이르는 다양한 약리 작용을 나타내는 녹차의 주요 기능성 성분이다. 현재까지 알려진 녹차의 카테킨류는 (+)catechin(C), (-)epicatechin(EC), (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (+)epigallocatechin(EGC), (-)epicatechin gallate(EGC) 등이 있다. 본 발명에 사용된 카테킨은 녹차로부터

추출하였으며, EC, EGC, EGCG, ECG를 주성분으로 하지만, 상기 카테킨에만 한정되는 것은 아니다.

- 28> 한편, 녹차의 감칠 맛을 내는 아미노산 성분 중의 하나인 데아닌(theanine)은 카페인(cafeine)에 의해 유발되는 흥분 작용을 억제시키는 효능이 있으며, 실제로 사람이 섭취하였을 때 편안하고 안정한 상태에서 나타나는 α 파의 출현 증가가 관찰되었다고 한다(Nippon Nogeikagaku Kaishi. 72(2), 153-157 (1998)). 본 발명에 사용된 데아닌은 녹차로부터 추출한 L-form, 또는 화학적으로 합성된 L-theanine, D-theanine, DL-theanine 어떤 쪽도 가능하며, 기타 다른 제조법으로도 가능하고 특별히 한정되는 것은 아니다.
- 29> 본 발명의 추출방법은 본 발명 기술분야에 통상적으로 알려져 있는 방법을 적의 선정 및 응용하여 이용할 수 있다.
- 30> 본 발명의 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 조성물은 지방세포 내 중성지방을 분해하는 효과가 매우 우수하다. 즉, 지방세포(adipocyte) 내의 중성지방(triglyceride)을 유리 지방산(free fatty acid)과 글리세롤(glycerol)으로 분해함으로써, 지방 분해를 촉진시키는 효능이 있다. 이는 본 발명의 조성물이 지방세포로 분화된 3T3-L1 세포에서 β_3 -adrenergic receptor의 발현을 증가시켜 세포 내의 중성지방을 분해하는 과정을 촉진하는 효과가 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 조성물을 피부 도포시, 세포 내의 중성지방 분해가 촉진되어 체지방을 효과적으로 제거할 수 있다.
- 31> 또한, 본 발명의 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 조성물은 지방세포의 분화를 억제하고 지방세포 내 중성지방의 축적을 방지하는 효과가 매우 우수하다. 즉, 피하 지방을 구성하는 지방세포가 비대해지거나 그 수가

증가하는 것을 막아주는 효능이 있다. 이는 본 발명의 조성물이 지방세포로 분화된 3T3-L1 세포에서 지방세포 분화의 표식인자인 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)효소의 활성을 극적으로 감소시키는 효과가 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 조성물을 피부 도포시, 지방세포의 생성 및 비대를 억제하여 체지방이 증가하는 것을 효과적으로 차단할 수 있다.

- 32> 또한, 본 발명에 따른 조성물의 용도는 상기의 피하 지방의 감소 효과에만 국한되는 것이 아니라, 여성의 셀룰라이트 부위에서 비대해진 지방세포에 의한 울퉁불퉁함을 감소시켜 탄력과 매끄러움 회복에 뛰어난 안티 셀룰라이트 화장품의 제조를 위한 용도로도 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 녹차로부터 추출한 천연 추출물이므로, 피부에 대한 자극이 거의 없어 안전하게 사용될 수 있다.
- 33> 한편, 본 발명의 조성물은 이미 성숙한 지방세포에 과도하게 축적되어 있는 중성지방을 분해 및 배출시키는 작용이 있을 뿐만 아니라 지방세포로의 분화를 방지하므로 비만을 해소함과 동시에 예방할 수 있는 물질이다. 즉, 종래 기술이 지방세포의 분화 또는 지방분해의 촉진 등 한 가지 효능만을 목적으로 하는 소극적인 개념인 반면, 본 발명은 이미 생긴 지방세포의 지방을 분해시킬 수도 있으면서, 지방세포의 생성을 막는 적극적인 개념의 비만 해소 및 억제 물질인 것이다.
- 34> 본 발명의 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 조성물에서 성분들의 혼합방법은 당 기술 분야에서 통상 사용되고 있는 혼합 방법을 적의 선정 및 응용하여 이용가능하며, 이 때 혼합을 용이하게 하는 기타 첨가제를 적의 선정하여 배합할 수 있다.

- 35> 본 발명의 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하는 조성물은 상기 데아닌 및 카테킨을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~20중량%를 함유하는 것이 바람직하나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- 36> 본 발명의 피부 외용제 조성물은 데아닌 및 카테킨을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유함으로써, 피하 지방을 감소시켜 날씬한 몸매를 가꾸는데 효과적이며, 피부용 제형으로 투여시 피하 지방을 분해하는 슬리밍 효과, 셀룰라이트 제거 효과 및 탄력 증진 효과가 우수하다.
- 37> 본 발명의 녹차의 효능성분을 함유하는 피부 외용제 조성물은 지방의 분해와 여성 피부의 탄력, 아름다움 및 유연함을 목적으로 한다면, 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로 예를 들면, 유연화장수, 영양화장수, 영양 로션, 마사지크림, 영양크림, 팩, 젤 또는 피부 점착 타입 화장료의 제형을 갖는 화장료 조성물일 수 있으며, 또한, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제와 같은 경피 투여형 제형일 수 있다.
- 38> 또한, 각 제형의 피부 외용제 조성물에 있어서, 상기한 본 발명의 필수성분인 데아닌과 카테킨 이외의 다른 성분들을 기타 피부 외용제의 제형 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- 39> 이하, 실시예 및 비교예를 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명이 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

<40> [제조예] 카테킨(Catechin)의 추출

41> 녹차잎 2kg에 물 10ℓ를 가하여 80℃에서 5시간 동안 방치한 다음, 수거한 여액과 그 잔사에 물 5ℓ를 가하여 80℃에서 3시간 동안 방치한 여액을 함께 모았다. 모은 여액을 여과지로 여과한 후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 분획한 후, 농축하고 다시 클로로포름(chloroform)으로 분획하여 카페인(cafeine)을 제거한 다음 농축하였다. 분액을 다시 Sepharose 컬럼(column)에 통과시킨 후, 메틸렌 클로라이드(methylene chloride)와 메탄올(methanol)의 1:1 혼합액으로 추출한 분액을 40℃에서 농축하여 녹차 카테킨(catechin) 분말을 얻었다.

42> [참고예] 지방세포의 분화

43> 생쥐의 섬유아세포주(fibroblast cell line)인 3T3-L1 세포를 10%의 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 DMEM(Dulbecos modified eagles medium, GIBCO BRL, Life Technologies 社) 배지가 담긴 6 well 배양 플레이트(culture plate)에 1×10^5 cells/well로 부착시켰다. 2일이 지난 후, 다시 새로운 DMEM(10% FBS 함유) 배지로 교환하고 2일 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 배양한 세포를 다시 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린(insulin), 0.5mM IBMX 및 $0.25 \mu\text{M}$ 덱사메타손(dexamethasone)을 함유한 DMEM(10% FBS 함유)로 분화 유도를 하고, 2일이 경과한 후 다시 인슐린이 포함된 DMEM으로 교환하여 5일 동안 배양하였다. 5일 후 다시 정상 배지(DMEM, 10% FBS 함유)로 교환하고 상기 세포가 형태적으로 지방세포로 변화할 때까지 관찰하면서 배양하였다.

44> <시험예 1> 테아닌(Theanine)의 중성지방 분해 촉진 효과

- 45> 녹차의 주요 효능 성분인 테아닌(theanine)의 지방세포 내 중성지방 분해 촉진 효능을 평가하기 위하여 상기 참고예의 방법으로 분화가 완료된 3T3-L1 지방세포를 이용하여 실험을 실시하였다.
- 46> 3T3-L1 지방세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하고, 지방산이 없는 0.5% 우혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 포함한 무색의 DMEM을 첨가한 후 취하여 각각 실험에 사용하였다. 테아닌은 일본 율전공업주식회사(97%이상)로부터 구입하여 사용하였으며, 글리세롤의 정량은 미국 시그마 社(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입한 GPO-trinder kit를 이용한 발색반응법으로 하였으며, ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 대조군은 시험물질이나 비교물질을 첨가하지 않은 배지만을 사용한 것이고, 그 결과 값을 100%로 하였을 때 기타 값을 환산하여 나타내었다. 또한, 양성 비교군으로 카페인을 동일 농도로 처리한 것을 사용하였으며, 지방 분해 정도는 지방세포로부터 배양액 중으로 유리된 글리세롤 농도를 측정함으로써 판단하였다. 그 결과를 하기 도 1에 나타내었다.
- 47> 하기 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 녹차로부터 추출한 테아닌을 처리한 군은 대조군과 비교했을 때 지방세포로부터 배양액 중으로 유리되는 글리세롤의 농도가 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히, 테아닌은 고농도에서도 세포 독성이 전혀 나타나지 않으면서도 기존에 지방 분해 효능이 알려져 있는 양성 대조군 카페인보다 동일 농도에서 더 우수한 지방분해 효과가 있음을 알 수 있었다.

48> <시험예 2> 테아닌(Theanine)의 β_3 -adrenergic receptor 발현 조절 효과

- 49> 녹차의 주요 효능 성분인 테아닌(theanine)의 지방세포 내 중성지방 분해 촉진효과의 메커니즘을 알아보기 위하여, 상기 참고예의 방법으로 분화가 완료된 3T3-L1 지방세포를 이용하였다. 다음, 상기 시험에 1과 동일한 테아닌 및 기타 비교 물질(카페인, 대조군)을 0.005%의 농도로 처리하고, 24시간이 지난 세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과를 하기 도 2에 나타내었다.
- 50> 상기 RT-PCR kit는 TaKaRa사로부터 구입하여 사용하였으며, β_3 -adrenergic receptor의 primer는 bioneer사로부터 구입하여 사용하였다.
- 51> 하기 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 테아닌의 처리에 의해 지방세포에서 지방분해의 신호가 되는 β_3 -adrenergic receptor의 발현이 월등하게 증가함을 알 수 있으며, 따라서 테아닌의 지방분해 효과가 상기 receptor의 발현 증가에 기인한 것임을 확인하였다.
- 52> <시험예 3> 녹차 카테킨(catechin)의 지방세포 분화 억제 효과
- 53> 녹차 카테킨(catechin)의 지방세포 내 중성 지방 생성 촉진 효과를 평가하기 위하여 섬유아세포주를 이용한 배양 및 흡광도 측정 실험을 실시하였다.
- 54> 상기 참고예와 동일하게 지방세포로 분화시킨 쥐의 섬유아세포 3T3-L1를 PBS로 3회 세척한 후 추출완충액(extraction buffer)(20mM Tris, 1mM EDTA 및 1mM 2-머캅토에탄올)으로 수확하였다. 모은 세포를 얼음 상에서 G26 needle로 6회 통과한 다음, 15000 Xg, 4℃에서 3분간 원심분리하고 상층액만을 취하여 실험에 사용하였다.
- 55> GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)의 활성을 측정하기 위하여 상기에서 제조된 세포 추출물에 0.1M triethanolamine, 2.5mM EDTA, 0.1mM 2-mercaptoethanol, 125uM

NADH(nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), 100uM

DHAP(dehydroxyacetonephosphate)를 포함한 GPDH assay buffer를 첨가하여 340nm에 2분간 흡광도의 감소 정도를 측정하였다. 변화량은 단백질 1mg당 dA/min값으로 표시하였으며, 대조군은 시험물질이나 비교물질을 첨가하지 않은 배지만을 사용한 것이고, 그 결과값을 100%로 하였을 때 기타값을 환산하여 나타내었다. 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다.

56> 하기 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 녹차로부터 추출한 카테킨을 3T3-L1 세포의 분화 시 처리하였을 때 대조군과 비교하여 분화가 현저히 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다.

57> <시험예 4> 테아닌(Theanine)과 카테킨(catechin)의 중성지방 억제 효과

58> 녹차 테아닌(theanine)과 카테킨(catechin)에 의한 지방세포 내 중성 지방 생성 촉진 효과를 평가하기 위하여, 섬유아세포주를 이용한 배양 및 흡광도 측정 실험을 실시하였다.

59> 상기 시험예 3과 동일하게 제조된 세포추출물을 미국 시그마 社(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입한 GPO-trinder kit를 사용하여 중성지방을 발색반응시킨 후 540nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 하기 도 4에 나타내었다.

60> 하기 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 녹차의 대표적 활성 물질인 테아닌과 카테킨을 각각 3T3-L1 세포의 분화 시 처리하였을 때 대조군과 비교하여 중성지방량이 감소하는 현상을 관찰할 수 있었으며, 두 가지 성분을 병용 처리하였을 때 중성지방 축적 정도가 현저히 감소함을 확인하였다.

61> <시험예 5> 녹차 효능 성분의 피부 자극 정도 평가

- 32> 뉴질랜드산 흰토끼의 피부에 부형이상의 결과로부터 녹차 효능성분의 자극 정도를 다음과 같이 관찰하였다.
- 33> 부형제(vehicle) 또는 10% 테아닌(theanine) 및 10% 카테킨(catechin)을 단독 또는 병용하여 1일 2회 간격으로 4일간 총 8회 뉴질랜드산 흰토끼의 피부에 도포하였다. 도포 후 홍반 및 가피 형성 평점과 부종 평점 값을 누적시켜 피부누적자극 지수를 구하였다. 피부누적자극 지수는 하기 표 1에 나타난 판정 기준에 따라 평가하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 결과에 나타난 자극 지수는 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 피부 일차 자극 지수(Primary Irritation Index, P.I.I.)의 산출 방법에 따랐다(Draize, J.H., Appraisal of the safety of chemical in foods, drugs and cosmetics).

64> 【표 1】

피부자극의 정도		평점
홍반과 가피형성	홍반이 없음	0
	아주 경도의 홍반(육안으로 겨우 식별한 정도)	1
	명료한 홍반	2
	중증도에서 강한 홍반	3
	심홍색의 강한 홍반과 가피 형성	4
부종형성	부종없음	0
	매우 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
	명료한 부종(주위와 명료한 구분이 됨)	2
	중증도의 부종(1mm정도 부어 올랐을 경우)	3
	강한부종(1mm이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
[주] 피부일차자극지수=(홍반평점과 부종평점의 합의 평균치)/4		

65> 【표 2】

	피부 일차 자극지수(0~4)
부형제	0.7
10% theanine 용액	0.7
10% catechin 용액	0.8
10% theanine/10% catechin용액	0.8

36> 상기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 녹차 효능 성분이 대조군과 비교했을 때 피부 자극이 거의 없음을 알 수 있었다.

37> [실시에 1 및 비교예 1]

38> 하기 표 3의 조성으로 슬리밍/안티 셀룰라이트 로션의 형태로 실시에 1 및 비교예 1을 제조하였다.

39> 【표 3】

성분	함량(중량%)	
	실시에 1	비교예 1
정제수	To 100	To 100
테아닌(theanine)	1.00	-
카테킨(catechin)	1.00	-
식물성 경화유	1.50	1.50
스테아린산	0.60	0.60
폴리글리세롤-10 펜타스테아릭 & 베헤닐알코올 & 소듐 스테아로일 락틸레이트	1.00	1.00
아라키딜 베헤닐 알코올&아라키딜글루코사이드	1.00	1.00
세틸아릴 알코올&세틸아릴글루코사이드	2.00	2.00
PEG-100 스테아레이트&글리세롤 올레이트&프로필렌글리콜	1.50	1.50
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	4.00	4.00
메도우폼 열매기름	3.00	3.00
세틸 옥타노에이트	4.00	4.00
사이클로메티콘	6.00	6.00
메틸파라벤	0.20	0.20
프로필 파라벤	0.10	0.10
디소듐 EDTA	0.02	0.02
트리메탄올 아민	0.13	0.13
글리세린	8.00	8.00

370> <시험예 6> 녹차 효능 성분의 슬리밍 효과

- 1> 국소 비만이나 셀룰라이트가 있는 여성 중 BMI(Body Mass Index, 체중(kg)/신장(m)²)가 21~27인 25~35세의 성인 여성 50명을 대상으로 8주 동안 아침과 저녁 하루 2회 한쪽 허벅지에 집에서 사용자의 마사지와 함께 상기 실시예 1 및 비교예 1의 로션을 사용하고 8주 동안 사용전, 사용후를 기기평가, 연구자(피부과 의사)에 의한 평가 및 설문평가에 의해 효과여부를 판단하였다.
- 2> [허벅지 둘레]
- 3> 허벅지 둘레는 줄자(단위:cm)를 이용하여 양쪽 허벅지 중 일정한 부위에 표시를 한 후 측정을 하였으며, 허벅지의 측정 부위는 두 부위, 즉 허벅지 상단부와 가운데 부분에서 측정하였다. 얻어진 수치는 양측검정으로 Student t test 또는 Wilcoxon test를 이용하여 사용전과 사용후를 비교하여 통계적인 유의성을 분석하였다(유의수준 $\alpha = 0.05$). 분산과 분포의 균질성을 확인하기 위해 각각 Levene test와 Kolmogorov-Smirnov test를 수행하여 균일한 경우 Student t test를 사용하였다. 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다.
- 74> [셀룰라이트의 두께]
- 75> 초음파를 이용한 피하 지방층과 침윤된 셀룰라이트의 두께(단위:mm) 측정은 Ultrasound-EuB 415 US scanner를 이용하였으며, 얻어진 수치는 양측검정으로 Student t test 또는 Wilcoxon test를 이용하여 사용전과 사용후를 비교하여 통계적인 유의성을 분석하였다(유의수준 $\alpha = 0.05$). 분산과 분포의 균질성을 확인하기 위해 각각 Levene test와 Kolmogorov-Smirnov test를 수행하여 균일한 경우 Student t test를 사용하였다. 그 결과를 하기 도 7~도 8에 나타내었다.
- 76> [육안 평가]

7> 연구자에 의한 육안 평가는 탄력과 셀룰라이트 정도에 의해 평가하였다. 얻어진 수치는 양측검정으로 Wilcoxon test를 이용하여 사용전과 사용후를 비교하여 통계적인 유의성을 분석하였다(유의수준 $\alpha = 0.05$). 평가 지표 중 탄력은 최하 1점에서 최고 9점까지 9 단계로 평가하였으며, 셀룰라이트 정도는 육안 평가에 의해 0점에서 4점까지 5단계로 평가하였다. 그 결과를 하기 도 7에 나타내었다.

8> [사용자 평가]

9> 사용자에 의한 평가는 자가 평가 및 설문 평가를 중심으로 수행하였다. 자가 평가지표는 최하 0점에서 최고 9점까지 10단계로 점수를 부여하였고, 지표는 탄력과 셀룰라이트의 정도로 하였다. 그 결과를 하기 표 4 및 도 8에 나타내었다.

10> [피부안전성 평가]

11> 시험 기간 동안 피부과 의사에게 의뢰하여 피부 자극 및 부작용 등을 관찰하여 피부 안전성을 평가하였다. 평가는 상기 시험에 5와 동일한 방법으로 실시하였으며, 평가기준은 상기 표 1과 동일하게 적용하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

12> 【표 4】

설문평가항목	응답자 yes 비율(%)
상쾌함(freshness)	96
매끄러운 피부(smooth skin)	85
편안함(comfort)	80
부드러운 피부(soft skin)	72
아름다운 피부(beautiful skin)	69

13>

【표 5】

	피부 일차 자극지수(0~4)
부형제	0.7
10% theanine 용액	0.7
10% catechin 용액	0.8
10% theanine/10% catechin-용액	0.8

- 4> 상기 실시예 1 및 비교예 1을 사용한 지 8주 후 허벅지 둘레를 측정 및 비교한 결과, 하
기 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 비교예 1에 비해 녹차 효능 성분을 첨가한 실시예 1을 사
용한 경우 허벅지 둘레가 1.0cm 감소한 것으로 나타나 통계적으로 유의한 결과를 나타내었다.
- 5> 하기 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1을 사용한 허벅지에서 사용전과 비교하여
피하 지방이 3.2% 감소하여 통계적으로 유의한 결과를 보였으며, 반면 비교예 1을 사용한 허
벅지에서는 유의한 변화가 없음을 확인하였다.
- 6> 하기 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 연구자에 의한 효능 평가에서 비교예 1에 비해 실시예
1을 사용한 부위에서 셀룰라이트 감소(-28%) 및 피부 탄력 증가(+18%)가 통계적으로 유의한 것
으로 나타났다.
- 7> 하기 도 8에서 보는 바와 같이, 사용자에 의한 효능 평가에서 제형예를 사용한 부위에서 셀룰
라이트 감소 효과(-31%) 및 피부 탄력 증가(+19%)가 통계적으로 유의하게 나타났다.
- 8> 상기 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 사용자에 따른 사용감 평가에서 응답자의 대부분
이 녹차 테아닌과 카테킨이 함유된 조성물을 8주 동안 사용한 후 상쾌함(96%)과 매끄러운 피부
(85%)을 느꼈다고 응답하였고, 그 외에 편안함 (80%), 부드러운 피부 (72%) 및 아름다운 피부
(69%)의 항목에 대해서도 과반수 이상이 그렇다고 응답하였다.

39> 상기 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 녹차효능 성분이 대조군과 비교하여 사람피부에서 자극이 거의 없음을 알 수 있었다.

30> 이상의 결과로부터, 녹차 테아닌과 카테킨을 함유하는 조성물이 피하 지방 감소, 여성의 셀룰라이트 감소 및 탄력 증진에 효과적이라는 사실을 알 수 있다. 또한, 상기 조성물의 사용감이 매우 우수함을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

91> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 지방세포 내에 축적되어 있는 중성지방을 글리세롤과 유리 지방산으로 분해하여 배출하는 과정을 촉진하는 효과가 있고, 피하 지방층을 감소시켜 날씬한 몸매를 만드는데 효과가 있을 뿐만 아니라, 울퉁불퉁한 피부의 원인이 되는 셀룰라이트를 감소시키는 효과가 있어 탄력 있고 매끈한 피부를 만들어 주는 녹차 효능 성분을 함유하여 새로운 개념의 안티-셀룰라이트 화장품의 제조에 적용할 수 있는 피부 외용제 조성물을 제공함으로써, 화장품 제조 산업상 매우 유용한 발명이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

지방분해용 조성물로서, 유효성분으로 테아닌(theanine) 및 카테킨(catechin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 함유하여 세포내의 중성지방 분해를 촉진함을 특징으로 하는 세포내 지방분해용 피부외용제 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 테아닌 및 카테킨을 녹차에서 추출된 것임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 테아닌(theanine)은 L-theanine, D-theanine, 및 DL-theanine에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 카테킨(catechin)은 (+)catechin(C), (-) epicatechin(EC), (-)epigallocatechin-3-gallate(EGCG), (+)epigallocatechin (EGC), 및 (-)epicatechin gallate(EGC)에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 피부외용제 조성물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~20중량%의 양으로 함유함을 특징으로 하는 피부외용제 조성물.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 데아닌은 지방세포의 β_3 -adrenergic receptor의 발현을 증가시켜 지방 분해를 촉진함을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

【청구항 7】

비만억제용 피부외용제 조성물에 있어서, 유효성분으로 데아닌(theanine) 및 카테킨(catechin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 함유하여 지방세포의 분화를 억제함을 특징으로 하는 비만억제용 피부외용제 조성물.

【청구항 8】

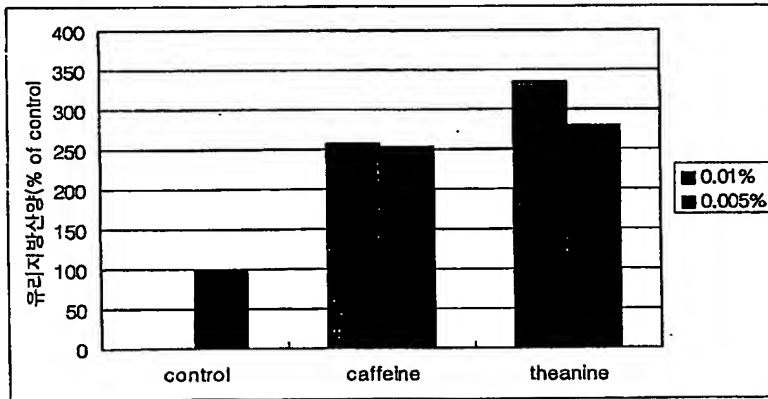
안티-셀룰라이트용 피부외용제 조성물에 있어서, 유효성분으로 데아닌(theanine) 및 카테킨(catechin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 함유하여 셀룰라이트를 감소시키는 것을 특징으로 하는 안티-셀룰라이트용 피부외용제 조성물.

【청구항 9】

슬리밍용 피부외용제 조성물에 있어서, 유효성분으로 데아닌(theanine) 및 카테킨(catechin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 함유하여 국소비만을 감소시키는 것을 특징으로 하는 슬리밍용 피부외용제 조성물.

【도면】

【도 1】

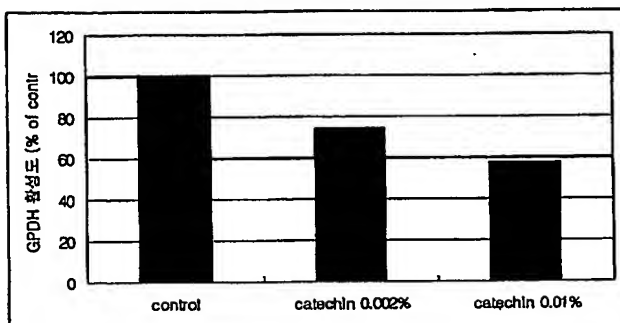


【도 2】

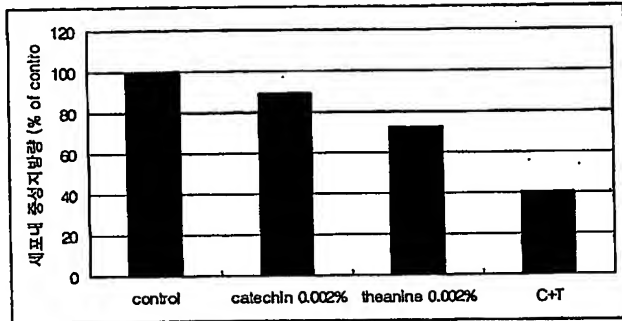
A B C



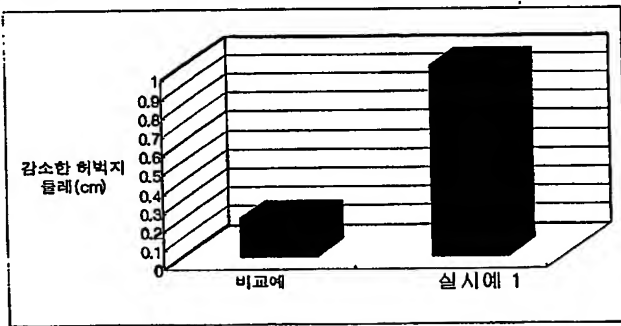
【도 3】



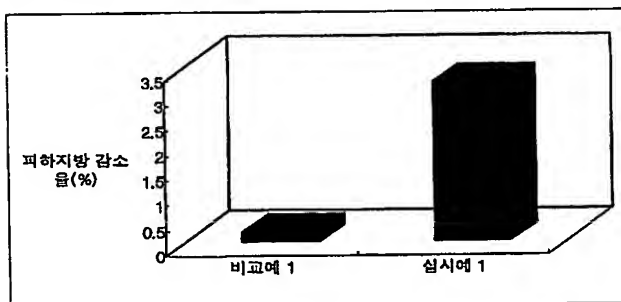
【도 4】



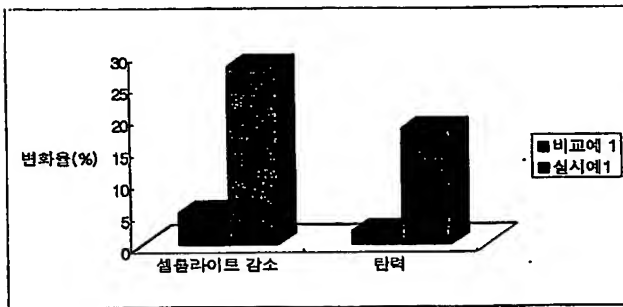
【도 5】



【도 6】



【도 7】



【도 8】

